

**Új típusú poli(aszpartamid) alapú hatóanyag konjugátumok és
gélek kifejlesztése orvosi és gyógyszerészeti célokra**

Doktori Tézisek

Juriga Dávid

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Zrínyi Miklós, MTA tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Nemes Péter, DSc., egyetemi tanár

Dr. Budai Marianna, PhD., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Török Tamás, DSc., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Klebovich Imre, DSc., egyetemi tanár

Dr. Huszthy Péter, DSc., egyetemi tanár

Budapest

2018

1 Bevezetés

Polimerek orvosi és gyógyszerészeti alkalmazásaira szinte számtalan példát találhatunk egészen a csomagoló anyagoktól kiindulva, a különböző implantátumok és gyógyszerformulák segédanyagain át, a korszerű sztentekig vagy hatóanyag leadó rendszerekig bezárólag. Éppen ezért nem meglepő, hogy napjaink gyógyszerészeti és orvosi biológiai kutatásainak a középpontjában is különböző polimerekre épülő anyagok állnak. Ezek közül is a két leginkább kutatott alkalmazás a gyógyszerészet területén a hatóanyag hordozó rendszerek, míg az orvosi biológiai kutatások között a mesterséges szövetépítéshez használt szövetámaszok kiépítése. Ilyen jellegű alkalmazásoknál fontos, hogy a polimer molekula biokompatibilis, vagyis a szervezetből nem váltson ki immunválaszt, és biodegradábilis, tehát a szervezet által lebontható legyen. Ezeket a polimereket nevezhetjük biopolimereknek.

Ilyen biopolimerekre épülő gyógyszerhatóanyag-hordozó rendszerek segítségével növelhetjük a hatóanyag hasznosulását a szervezetben, illetve vízoldhatóságát vagy éppen lipofilitását, valamint képesek vagyunk elérni a hatóanyag terápiás célponthoz való eljutását és szabályozott leadását. Ennek segítségével csökkenthetjük az alkalmazott hatóanyag mennyiségét így az általa kiváltott mellékhatásokat is, miközben a terápia hatékonyságát nagymértékben megnövelhetjük. A polimer-hatóanyag-hordozó rendszerek egyik csoportja a polimer-hatóanyag konjugátumok, amelyek esetében a hatóanyag kovalens kötással kapcsolódik a hordozó polimer molekulához. Ezek a makromolekuláris elő-hatóanyag formulák önmagukban inaktívak, a hatóanyag felszabadulása a célszervben valamilyen normál metabolikus folyamat vagy a környezet valamely tulajdonságának (pl.: pH, hőmérséklet) megváltozására adott válaszreakció hatására történhet. A

konjugátumokból elektrosztatikus szálhúzás alkalmazásával nano-szálas rendszereket állíthatunk elő, amelyek tovább növelhetik a hatóanyag hasznosulását a szervezetben.

Biopolimerekre épülő anyagokat alkalmazhatunk szövettámaszként a szövetmérnökség területén. A folyamat során a páciens saját reprodukcióra képes sejteinek izolálásával, majd a szövettámaszon történő szaporításával állíthatjuk elő a kívánt mesterséges szövetet, amelyet ezután visszaültethetünk a sérült területre. A szövettámaszoknak hasonló tulajdonságokkal kell rendelkeznie, mint a természetes extracelluláris mátrixnak (ECM), amely a kötőszöveti sejteket körülvevő egy kollagénből és egyéb polimerekből álló 3 dimenziós hálózat. Az ECM a kismolekulák illetve a sejtek számára átjárható, dinamikusan változó rendszer, amelynek egyik feladata, hogy a sejtek számára támasztórendszert biztosítson osztódásuk során. Ehhez hasonló anyagok a polimer hidrogélek, amelyek egy 3 dimenziós polimer térháló és az azt kitöltő víz vagy vizes oldat elegye. Ebből kifolyólag rendelkeznek mind a folyadékok (pl.: kis molekulák számára átjárhatóak), mind pedig a szilárd anyagok (pl.: alaktartóak, deformálhatóak) tulajdonságaival, így szövettámaszként alkalmazhatóak lehetnek. Mivel a hidrogélek tulajdonságait az alkalmazott polimer határozza meg, ezért fontos a megfelelő polimer kiválasztása.

A fehérjékhez hasonló kémiai szerkezetű szintetikus poli(aminosav)-ak alapjául szolgálhatnak mind konjugátumok, mind pedig hidrogélek szintéziséhez, azonban ezen biopolimerek szintetikus úton történő előállítása nehézkes és költséges. Kutatásaim ezért az egyik egyszerűen előállítható poli(aminosav), a poli(aszparaginsav) és származékainak az előzőekben bemutatott alkalmazására fókuszáltak.

2 Célkitűzés

PhD kutatómunkám fő célja volt a poli(aszparaginsav) és származékainak gyógyszerészeti és orvosi biológiai alkalmazásának vizsgálata. Célkitűzéseim az alábbi pontokban foglalhatóak össze:

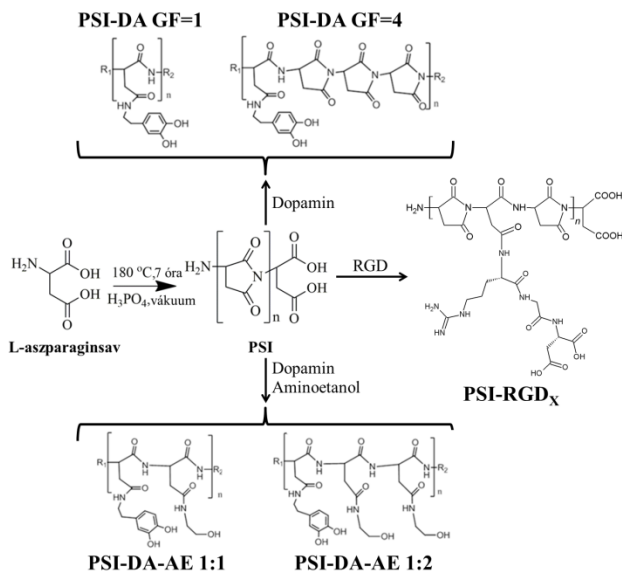
1. Különböző kémiai összetételű poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok szintézise és fizikai tulajdonságainak vizsgálata. A dopamin leszakadási kinetikájának feltérképezése különböző enzimek jelenlétében.
2. A konjugátumokat felhasználva nano méret tartományba eső szálas implantátumok előállítása elektrosztatikus szálhúzással. A formulázás hatásának vizsgálata a dopamin leszakadás kinetikájára, illetve a szálas rendszerek *in vitro* citotoxicitásának vizsgálata.
3. Különböző kémiai összetételű és rugalmasságú poli(aszparaginsav) alapú hidrogélek szövetámaszként való alkalmazhatósága MG-63 oszteoblaszt típusú sejtek tenyésztéséhez. A gélek stabilitásának, illetve biodegradabilitásának vizsgálata a sejtenyésztés során alkalmazott körülmények között.
4. Az előzőekben használt gélek szövetámaszként való alkalmazhatósága humán periodontális ligamentum (PDL) eredetű össejtek esetén. A kritikus paraméterek változtatása a sejtek életképességének növeléséhez.
5. Dopaminnal módosított poli(aszpartamid) alapú gélek alkalmazhatósága humán PDL össejtek tenyésztéséhez.

3 Módszerek

3.1 Poliszukcinimid (PSI) és poli(aszpartamid) alapú konjugátumok és polimerek előállítása

A poli(szukcinimid)-et L-aszparaginsav termikus polikondenzációjával állítottam elő alacsony nyomáson, 180 °C-n, foszforsav katalizátor jelenlétében (**1. ábra**). A nyers

polimert ezután dimetilformamidban oldottam majd vízben csaptam ki. A szűrést követően a polimert nagy mennyiségű vízzel mostam a semleges pH eléréséig. Előzetes eredményeink alapján a PSI átlagos molekulatömege 26 és 31 kDa közé esett [1-3].



1.ábra: PSI szintézise és módosítása dopaminnal, dopaminnal és aminoetanollal, illetve RGD tripeptiddel

A PSI-ben található ismétlődő egység, a szukcinimid gyűrű könnyedén módosítható primer amin csoportot tartalmazó vegyületekkel szobahőmérsékleten. Ennek köszönhetően, amin csoportot tartalmazó hatóanyag alkalmazásával poli(aszpartamid) alapú polimer-hatóanyag konjugátumokat szintetizálhatunk. Kutatómunkám során dopamin hatóanyagot kapcsoltam a PSI láncához különböző mennyiségben, illetve a dopamin mellett 2-aminoetanolt alkalmaztam a konjugátum vízoldhatóságának növelésére (**1. ábra**). A minták nevében található GF (graftolási fok) a monomer/dopamin mólarányát jellemzi. A dopamin tartalmú

konjugátumokon kívül Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptiddel különböző mértékben módosított polimereket is szintetizáltam, amelyeket poli(aszparaginsav) gélek előállításához használtam fel (1. ábra). Az előállított polimerek kémiai szerkezetét FTIR-ATR illetve ^1H -NMR és ^1H - ^1H COSY NMR technikákkal igazoltam.

3.2 Dopaminnal módosított konjugátumok formulázása elektrosztatikus szálképzéssel

A házilag elkészített elektrosztatikus szálképzéshez használt készülék egy fecskendőből, tompa fém Hamilton tűhegyből, egy fecskendőpumpából és egy egyenáramú tápegységből állt. A pozitív pólus (13-15 kV) a fémtűre, míg a negatív pólus egy a tűvel szemben elhelyezett alufóliával beborított gyűjtő lemezre volt kapcsolva [3]. Az elektrosztatikus szálképzés során a minták oldhatóságától és kémiai összetételétől függően különböző oldószereket illetve oldószer keverékeket alkalmaztam a konjugátumok különböző koncentrációjú oldatának elkészítéséhez. A tű és az alumínium gyűjtőlap távolsága minden minta esetében 15 cm volt. Az elkészített szálas rendszereket ezután pásztázó elektronmikroszkópiával, kétfoton és atomerő mikroszkópiával vizsgáltam. A szálas minták kémiai összetételét FTIR-ATR spektroszkópiával jellemeztem.

3.3 Por illetve szálas konjugátumok fizikai tulajdonságainak (oldhatóság, oldhatóság kinetika, lipofilitás, membrán permeabilitás) jellemzése

A por állagú konjugátumok oldhatóságának meghatározásához 0,1 g konjugátumot helyeztem 11 mL ultra tiszta vízbe, majd mértem az oldatok abszorbanciáját spektrofotométerrel 280 nm-n 24 és 48 óra után. A minták

lipofilitásának vizsgálatához elkészítettem a minták telített vizes oldatát majd ugyanolyan térfogatú n-oktanollal kevertem össze az oldatot egy rázóüvegben. A keveréket összeráztam majd 24 és 48 óra után meghatároztam spektrofotometriás méréssel a koncentrációkat a két fázisban, amelyek aránya megadja a minták lipofilitását. Mivel a csak dopamin tartalmú konjugátumok oldhatósága függ az időtől, ezért meghatároztam a por illetve nano-szálas konjugátumok oldhatóság kinetikáját vízben, illetve pH=7,5-es foszfát pufferben (PBS). Ehhez por minták esetében 0,3 g míg szálas minták esetében 0,05 g mintát helyeztem a közegbe és 48 óráig mértem az oldat abszorbanciáját. A membrán permeabilitás jellemzéséhez PAMPA technikát alkalmaztam. Ehhez 0,5 mg szálas mintát helyeztem a mikrotiter lemezbe, membrán modellként pedig izolecitin dodekánban készített 20 m/m%-s oldatát használtam. A membrán permeabilitás jellemzéséhez mértem a konjugátumok koncentrációját a membrán mindkét oldalán 4 és 28 óra elteltével spektrofotometriás úton.

3.4 Dopamin leszakadási kinetikájának meghatározása por, illetve szálas konjugátumokról

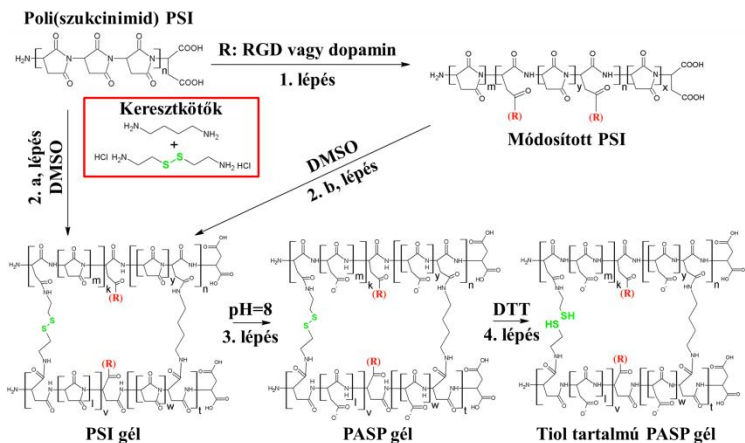
A dopamin leszakadási kinetikájának a méréséhez a por, illetve szálas konjugátumokat egy 3,5 kDa-s dializáló hártyába helyeztem. Ezután a mintákra 6 mL PBS illetve Bromelain vagy α -Kimotripszin PBS-ben készített oldatát (3 mg/mL) helyeztem, míg a dializáló hártyán kívülre 60 mL PBS-t töltöttem. A leszakadt dopamin mennyiségét a külső folyadék spektrofotometriás vizsgálatával határoztam meg 48 órán keresztül.

3.5 Szálas konjugátumok citotoxicitásának vizsgálata

A szálas konjugátumok citotoxicitásának vizsgálatához humán eredetű periodontális ligament (PDL) őssejteket alkalmaztam. A kísérletek során 10000 sejt/cm² sejtsűrűséggel dolgoztunk 96 lyukú mikrotiter lemezen. Az első kísérlet sorozatban 1 μ M - 1 mM koncentráció tartományban vizsgáltuk a szabad dopamin, illetve a PSI-DA-AE 1:2 konjugátumra kötött dopamin hatását a sejtek életképességére és morfológiájára. A sejtek életképességét 1 és 3 nap után WST-1 reagenssel határoztam meg, míg morfológiáját fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltam. A második kísérlet sorozatban a különböző szálas konjugátumok hatását vizsgáltam azonos koncentráción (250 μ M), azonban itt a sejtek morfológiáját kétfoton mikroszkóppal tanulmányoztam.

3.6 Poli(aszparaginsav) alapú gélek szintézise

Mivel a PSI könnyedén reakcióba vihető primer amin csoportokat tartalmazó vegyületekkel, így diaminokkal keresztkötések hozhatóak létre a polimer láncok között géleket szintetizálva. A PSI illetve a módosított PSI keresztkötéséhez két féle diamint, 1,4-diamonbutánt (DAB) illetve cisztamint (CYS) alkalmaztam. A PSI géleket ezután enyhe lúgos hidrolízisnek tettem ki, így poli(aszparaginsav) (PASP) géleket kaptam. A gélekben ezután a tiol csoportokat dititireitol (DTT) alkalmazásával alakítottam ki. Munkám során létrehoztam különböző mértékben dopamint, RGD-t, illetve tiol oldalláncot tartalmazó PASP géleket (2. ábra).



2.ábra: Módosítatlan és módosított PSI, PASP, illetve tiol tartalmú PASP gélek szintézisének lépései

3.7 PASP gélek degradációjának vizsgálata

A különböző keresztkötőket tartalmazó PASP gélek degradációját két kísérletben végeztem. Először a sejtenyésztéshez használt illetve a sejtek által termelt enzimek (Diszpáz, Tripszin-EDTA, Kollagenáz II) jelenlétében vizsgáltam hidrogél korongok tömegváltozását 48 napig. A második kísérlet sorozatban gél hengereket készítettem és vizsgáltam a tömegük, illetve a rugalmassági moduluszuk változását a sejtenyésztés során alkalmazott tápoldat jelenlétében 18 napig.

3.8 PASP gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságának vizsgálata

A gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságához két féle sejtet (MG-63 humán oszteosarkóma sejt, illetve humán PDL őssejt) használtam. A mérésekhez géلكorongokat készítettem, amelyek felszínére 20000 sejtet ültettem ki 200 μ L szuszpenzióban. MG-63 sejtek esetében az 1., 3., és 6., napon míg PDL őssejtek esetében az 1., 3., 7., és 14., napon

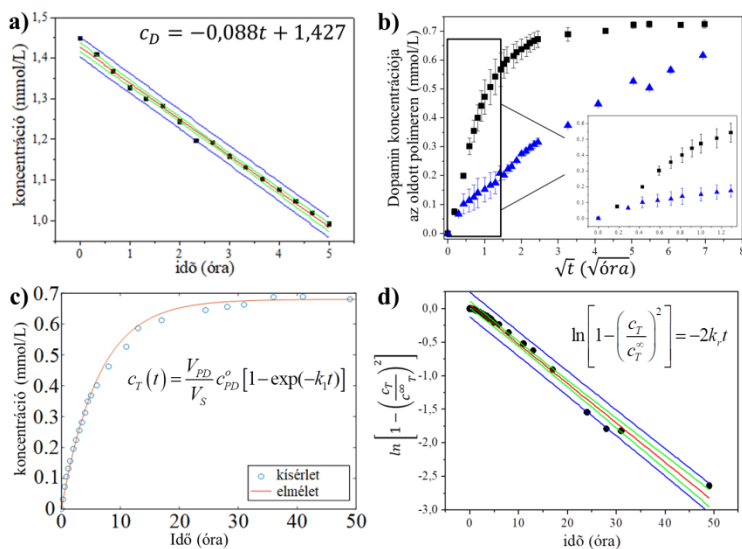
mértem a sejtek életképességét WST-1 módszerrel. A sejtek morfológiáját fáziskontraszt, míg a gél és a sejtek 2 és 3 dimenziós szerkezetét kétfoton mikroszkóp segítségével határoztam meg.

4 Eredmények

4.1 Dopamin leszakadás kinetikájának leírása por konjugátumok esetében (T1)

A dopamin leszakadási kinetikájának leírásához a szintetizált konjugátumokat két csoportra osztottuk: az aminoetanolt is tartalmazó minták pillanatszerűen oldódtak vízben, míg a csak dopamint tartalmazó minták oldhatósága függött az időtől. Mivel a dopamin leszakadása az oldat fázisban lévő konjugátumról történik, ezért az első esetben egy 1 lépéses hidrolízisről, míg a második esetben egy konszekutív folyamatról (oldódás majd hidrolízis) beszélhetünk. Így az első eset felhasználható arra, hogy meghatározzuk a leszakadási reakció rendjét, míg a második esetben pedig megállapíthatjuk, hogy a polimer oldhatósága vagy a dopamin leszakadása a sebesség meghatározó lépés. Azonban a dopamin bomlik a reakció körülményeken, ezért a reakció időbeli lefutásának ismerete elengedhetetlen a pontos kinetikai modell kidolgozásához. A 3. ábrán látható, hogy a dopamin bomlása lineárisan függ az időtől, így ez egy nulladrendű reakcióval írható le (**3. a ábra**). A csak dopamint tartalmazó konjugátumok oldhatósága lineárisan függ az idő négyzetgyökétől, ezért az oldhatóság kinetikáját a Higuchi féle oldhatóság kinetika jellemzi (**3. b ábra**). A dopamint és aminoetanolt is tartalmazó konjugátumok esetében, amennyiben a reakció sebessége egyenesen arányos a leszakadt dopamin mennyiségével folyamat elsőrendű kinetika szerint játszódik le. A 3. c ábrán látható differenciálegyenlet ezt az esetet szemlélteti, és látható, hogy az elméleti és a

kísérleti adatok jó egyezést mutatnak. Rosszul oldódó konjugátumok esetében a dopamin leszakadás egy Higuchi féle diffúzióval és az azt követő elsőrendű leszakadási kinetikával írható le. Ezt végtelenül hosszú mérési időkre megoldva a 3. d ábrán lévő egyenletet kapjuk, ahol látszik, hogy a logaritmikus tagot ábrázolva az idő függvényében a mérési pontokra jó egyezéssel egyenes illeszthető, amely igazolja a kinetikai leírás helyességét (3. d ábra).

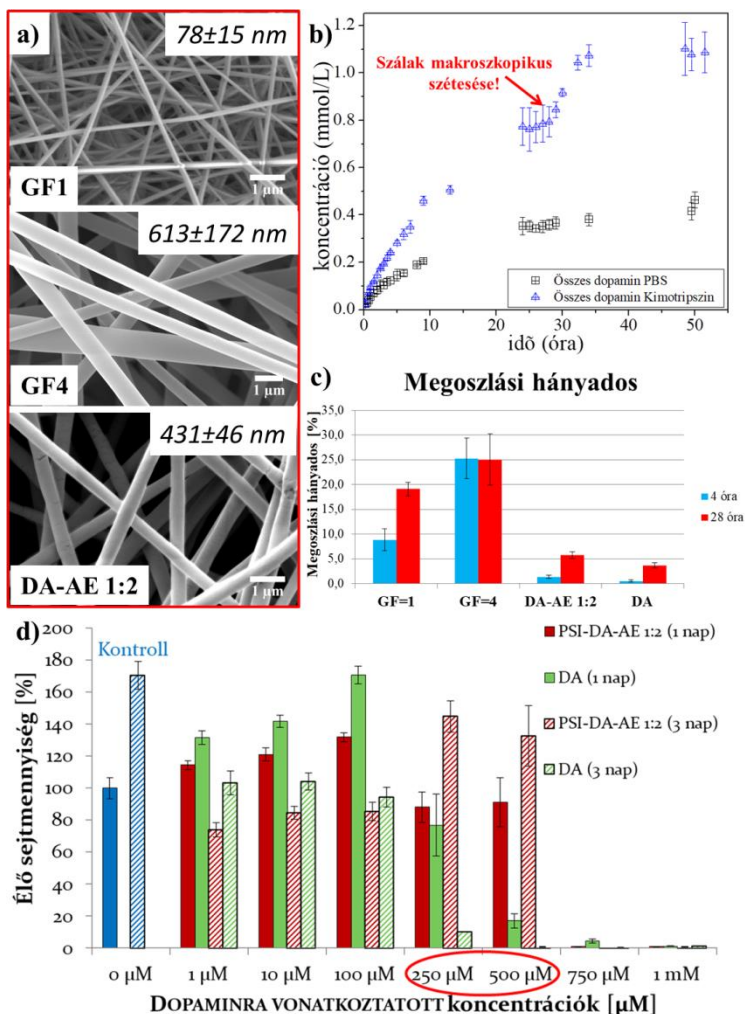


3.ábra: a) dopamin bomlási kinetikája, b) GF=1 és 4 konjugátumok oldhatóságának függése az idő négyzetgyökétől, c) dopamin leszakadásának időfüggése jól oldódó konjugátumok esetében, d) kinetikai konstans meghatározása rosszul oldódó konjugátum esetében

4.2 Elektrosztatikus szálhúzással előállított dopamin tartalmú konjugátumok vizsgálata (T2)

A pásztázó elektronmikroszkópiás felvételeken látható, hogy homogén, hibahely mentes szálakat állítottam elő a konjugátumokat felhasználva, amelyek átmérője a

nanométeres tartományba esik (**4. a ábra**). A formulázás hatással lehet a konjugátumok oldhatóság kinetikájára, amely befolyásolhatja a dopamin leszakadás kinetikáját. A dopamin leszakadás kinetikai mérésekből látható, hogy a dopamin jóval gyorsabban szabadul fel a szálas konjugátumokról, mint a por állagú minták esetében (**4. b ábra**). Emellett az is megfigyelhető, hogy a dopamin leszakadása 26 óra elteltével hirtelen megnő, amely α -Kimotripszin jelenlétében jelentősebb, mint PBS-ben. Ez a hirtelen koncentráció növekedés a szálas konjugátumok makroszkopikus szétesésének és hirtelen feloldódásának lehet a következménye (**4. b ábra**). Látható, hogy az α -Kimotripszin jelenléte nagymértékben meggyorsítja a dopamin leszakadását illetve megnöveli a felszabadult dopamin mennyiségét (**4. b ábra**). A hatóanyag hasznosulását a sejtmembránon való átjutása is befolyásolja. A PAMPA vizsgálatok alapján elmondható, hogy a dopamin mesterséges membránon való átjutását, a csak dopamint tartalmazó konjugátumok (GF=1 és 4) nagymértékben megnövelik, a DA-AE és a szabad dopaminhoz képest. Ez annak köszönhető, hogy ezek a konjugátumok kevesebb hidroxil csoport oldalláncot tartalmaznak, mint a PSI-DA-AE 1:2. A GF=4-es és a GF=1-es minta közötti különbséget feltehetően szintén ez okozza (**4. c ábra**). A citotoxicitási vizsgálatok alapján elmondható, hogy sem a dopamin sem a konjugátumra kötött dopamin nem citotoxikus 1-100 μ M koncentráció tartományban. 250 és 500 μ M koncentrációnál azonban a dopamin már citotoxikus hatású, azonban a konjugátumra kötött dopamin még ebben a tartományban sem csökkenti a PDL őssejtek életképességét. Magasabb koncentrációnál mind a szabad mind pedig a kötött dopamin citotoxikus (**4. d ábra**).

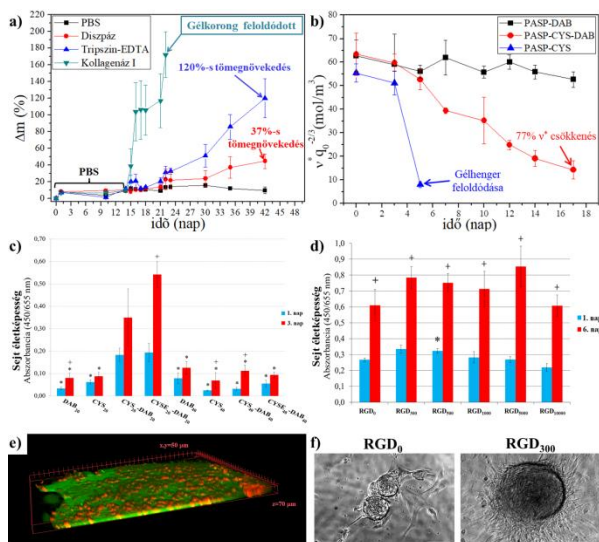


4.ábra: a) szálak SEM felvételei, b) dopamin lezszakadás időfüggése GF=1-s szálak konjugátum esetében, c) konjugátumok megoszlási hányadosa PAMPA mérésnél illetve d) citotoxicitás mérés eredményei

4.3 MG-63 oszteoszarkóma sejtek tenyésztése különböző PASP géleken illetve a gélek stabilitása (T3)

Az 5. a ábrán látható, hogy a csak cisztamin keresztkötőt tartalmazó PASP gélkorongok PBS-ben stabilak, hiszen tömegük nem változik 42 nap után sem. Tripszin-EDTA, illetve Diszpáz jelenlétében a korongok tömege monoton növekszik, ami kismértékű degradációra utal. Kollagenáz II jelenlétében a korongok tömege nagymértékben megnőtt már pár nap után majd a gélkorongok teljesen feloldódtak (**5. a ábra**). A gélek degradációja jellemezhető mind a rugalmassági moduluszuk, mind pedig a duzzadásfokuk változásával. A hálóláncok koncentrációja (v^*) a két értékből meghatározható, a mechanikai tulajdonságokat jobban reprezentáló mennyiség. A tápoldatban a gélhengerek hálólánc koncentrációja a csak DAB keresztkötőt tartalmazó gélek esetében nem változott, míg a csak CYS keresztkötőt tartalmazó gélek már 5 nap után feloldódtak. A vegyesen CYS és DAB keresztkötőt tartalmazó gélek hálólánc koncentrációja lecsökkent, azonban a gélek nem oldódtak fel, amiből a diszulfid hidak felnyílására következtethetünk (**5. b ábra**). A különböző géleken mért életképességi mutatókból látható (**5. c ábra**), hogy a sejtek megtapadását és életképességét a tiol csoportok jelenléte és a gélek rugalmassági moduluszának növekedése (PASP-CYSE₂₀-DAB₂₀) nagymértékben megnöveli. Emellett elmondható, hogy a sejtek életképessége a 3. napra megnövekedett mindegyik minta esetében. A kétfoton mikroszkópos kép alapján elmondható, hogy a sejtek képesek bejutni a tiol tartalmú gélkorong belsejébe (**5. e ábra**). Az RGD-vel módosított tiol tartalmú gélek életképességi mutatói alapján megfigyelhető, hogy az RGD mennyisége illetve jelenléte a gélekben nincs jelentős hatással az életképes

sejtek mennyiségére sem 1 sem pedig 6 nap után (**5. d ábra**). A fáziskontraszt mikroszkópos felvételek azonban mutatják, hogy az RGD jelenléte segíti a sejtek klaszterekben rendeződését, ami egyfajta oszteogén viselkedésre utal (**5. f ábra**).

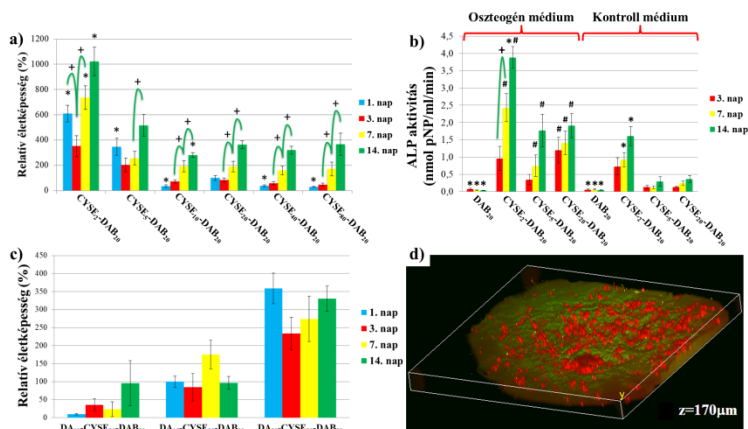


5. ábra: PASP-CYS géllorongok tömegváltozása különböző enzimek jelenlétében (a), géllhengerek degradációja tápoldatban (b), sejtek életképessége különböző PASP (c) és RGD tartalmú géleken (d), Sejtek háromdimenziós elhelyezkedése a géllorongon 2 foton mikroszkópiával vizsgálva (e) és klaszterekben rendeződése fáziskontraszt mikroszkópos felvételeken (f)

4.4 PDL őssejtek tenyésztése különböző tiol csoportot tartalmazó PASP géleken (T4)

A 6. a ábra alapján elmondható, hogy a tiol csoportok mennyiségének a növelése pozitív hatással van a sejtek letapadására, illetve a proliferációjára. Látható, hogy az életképes sejtek mennyisége a 14. napra nagymértékben megnő minden minta esetében. Az oszteogén irányú differenciációs kísérletek alapján elmondható, hogy

nagymennyiségű tiol csoport a sejtek spontán oszteogén irányú differenciációját indukálja (6. b ábra).



6. ábra: PDL őssejtek életképessége különböző tiol tartalmú géleken (a), PDL őssejtek indukált és spontán oszteogén irányú differenciációja (b), PDL őssejtek életképessége különböző dopamin tartalmú géleken (c) és 3 dimenziós elhelyezkedése dopamin tartalmú gélkorongon

4.5 PDL őssejtek tenyésztése különböző mennyiségben dopamint tartalmazó géleken

A legnagyobb életképességi mutatót a minden 20. monomeren dopamin oldalláncot tartalmazó gél esetében mértük (6. c ábra). A dopamin emellett indukálta a sejtek vertikális migrációját és proliferációját, amit a 6. d ábrán látható 3 dimenziós kétfoton kép igazol. A sejtek 170 µm mélyen képesek voltak behatolni a gél mátrixba, ami közel 5-6 sejtréteget jelent.

5 Következtetések

Biopolimerekre épülő polimer-hatóanyag konjugátumok illetve hidrogélek egyre inkább a gyógyszerészeti és orvosbiológiai kutatások középpontjában állnak. Ilyen jellegű alkalmazásokra a poli(aminosav)-ak

megfelelőek lehetnek, hiszen szerkezetük nagymértékben hasonlít a szervezetben is megtalálható fehérjékhez. Kutatómunkámban sikeresen állítottam elő poli(aszparaginsav)-ra épülő dopamin tartalmú hatóanyag konjugátumokat, illetve vizsgáltam poli(aszparaginsav) gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságát.

A konjugátumok esetében a dopamin leszakadási kinetikáját vizsgáltam, amely nagymértékben függ a konjugátum dopamin tartalmától, oldhatóságától illetve különböző enzimek jelenlététől. A kinetika jellemzéséhez egy részletes kinetikai leírást dolgoztam ki, mind jó, mind pedig rossz vízoldhatósággal rendelkező konjugátumokra. A 3. c ábrán látható, hogy jó vízoldhatósággal rendelkező konjugátumok (PSI-DA-AE) esetében a kísérleti adatok és az elméleti modell jó egyezést mutat. A diffúzióval egybekötött leszakadási kinetika jól használható, rosszul oldódó konjugátumok esetében a hatóanyag leszakadási kinetikájának leírására (**3. d ábra**). Az elektrosztatikus szálképzés segítségével homogén, hibahelyektől mentes nano-szálak konjugátumokat állítottam elő (**4. a ábra**). A formulázással a dopamin leszakadás kinetikája meggyorsítható, ami a megnövekedett fajlagos felületnek köszönhető. A szálak makroszkopikus szétesésével egy két lépcsős hatóanyag leadás érhető el (**4. b ábra**). A konjugátumok megnövelik a dopamin membránon való átjutását, mivel lipofilebbek, mint a szabad dopamin (**4. c ábra**). Emellett látható, hogy a konjugátumra kötött dopamin kevésbé citotoxikus, mint a szabad dopamin (**4. d ábra**).

Poli(aszparaginsav) gélek mechanikai illetve kémiai összetétele nagy hatással van mind az MG-63, mind pedig a PDL őssejtek életképességére és a gélen történő elhelyezkedésére. A gél keménységét növelve, és tiol csoportokat létrehozva a polimer láncon az MG-63 sejtek

adhéziója és proliferációja nagymértékben megnövekszik (**5. c ábra**). Ez abból adódik, hogy az MG-63 sejtek kemény szöveti sejtek, így a keményebb szövettámaszon jobban képesek szaporodni. A sejtek képesek beintegrálódni a polimer térhálóba (**5. e ábra**), illetve az RGD jelenléte a polimer gélben indukálja a sejtek klaszterekbe való szerveződését, ami oszteogén viselkedésre utal (**5. d és f ábra**). A degradációs kísérletek azt mutatják, hogy a csak ciszta mint tartalmazó gélek mind enzimek jelenlétében, mind pedig a sejtenyésztés során alkalmazott tápoldatban feloldódnak (**5. a és b ábra**). A gélek feloldódása a tiol csoportok felnyílásának a következménye, amit mind a kollagenáz II, mind pedig a tápoldatban található L-cisztein jelenléte indukál. A PDL őssejtek esetében a tiol csoportok további növelésével tovább növelhető a sejtek adhéziója (**6. a ábra**). Emellett látható, hogy a sejtek száma a 14. napig növekszik, amiből arra következtethetünk, hogy a tiol csoportok elősegítik a sejtek proliferációját is. A PDL őssejtek képesek oszteogén irányba differenciálódni a géleken, amelyet nagymennyiségű tiol csoport jelenléte önmagában indukál (**6. b ábra**). A dopamin jelenléte is jótékony hatással van a sejtek életképességére (**6. c ábra**), amennyiben minden 20. monomer tartalmaz dopamint. A nagyobb mennyiségű dopamin alkalmazásával (GF=10 vagy 15) csökken a gélek keménysége, illetve a dopamin a citotoxikus koncentráció felé emelkedik a gélekben, ami sejthalálhoz vezet. A dopamin emellett képes indukálni a sejtek vertikális migrációját, így a sejtek képesek beintegrálódni akár 5-6 sejtréteg vastagságban a polimer mátrixba (**6. d ábra**).

A dolgozat új tudományos eredményei a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Sikeresen állítottam elő olyan poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, amelyek elnyújtott hatóanyag leadást biztosítanak. (T1)

2. Sikeresen dolgoztam ki egy hatóanyag leszakadási kinetikai leírást kovalens polimer-hatóanyag konjugátumokra, amely használható lehet mind rossz, mind pedig jó vízoldhatóságú konjugátumok esetében. (T1)

3. Sikeresen állítottam elő homogén, nano-szálas poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, amely formulázása nagy hatással van a hatóanyag leszakadás kinetikájára. Az irodalomban elsőként vettem össze a hatóanyag leszakadás kinetikáját tömb, illetve szálas konjugátumok esetén. (T2)

4. Bebizonyítottam a poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok biokompatibilitását humán PDL őssejtek használatával. (T2)

5. Meghatároztam poli(aszparaginsav) gélek azon paramétereit, amelyek növelik a stabilitásukat, illetve csökkentik biodegradálhatóságukat az in vitro sejtenyésztés körülményein. (T3)

6. Megállapítottam, hogy a gélek keménységének a növelése és a tiol csoportok jelenléte előnyös hatással van mind MG-63 mind pedig humán PDL őssejtek életképességére és morfológiájára. Bebizonyítottam, hogy az RGD peptid szekvencia nem csak a sejtek letapadását, de klaszterekbe való rendeződését is indukálja. (T3)

7. Rámutattam, hogy a tiol csoport mennyiségének a növelésével a gélekben előidézhető PDL őssejtek spontán oszteogén irányú differenciációja. (T4)

8. Megállapítottam, hogy a dopamin beépítésével a gélekbe a PDL őssejtek horizontális migrációja előidézhető illetve növelhető a gélek sejtek általi degradációja. (T5)

6. Publikációk

5.1 Értekezéshez kapcsolódó közlemények

- [1] Juriga D, László I, Ludányi K, Klebovich I, Chae CH, Zrínyi M, (2018) Kinetics of dopamine release from poly(aspartamide)-based prodrugs. Acta Biomaterialia, online elérhető, IF₂₀₁₇: 6,319
doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.030>,
- [2] Juriga D, Nagy K, Jedlovszky-Hajdú A, Perczel-Kovács K, Chen YM, Varga G, Zrínyi M (2016) Biodegradation and Osteosarcoma Cell Cultivation on Poly(aspartic acid) Based Hydrogels. ACS Appl Mater Interfaces 8:23463–23476. IF₂₀₁₆: 7,504

5.2 Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

- [3] Molnar K, Juriga D, Nagy PM, Sinko K, Jedlovszky-Hajdu A, Zrínyi M (2014) Electrospun poly(aspartic acid) gel scaffolds for artificial extracellular matrix. Polym Int 63:1608–1615. IF₂₀₁₄: 2.409
- [4] Zrínyi M, Gyenes T, Juriga D, Kim J-H (2013) Volume change of double cross-linked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. Acta Biomater 9:5122–31. IF₂₀₁₃: 5,684